

- Di Piero, R.M., Rezende, J.A., Yuki, V.A., Pascholati, S.F., and Delfino, M.A., 2006. Transmission of Passion Fruit Woodiness Virus by *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae) and colonization of Passion Flower by the Vector. *Neotropical Entomology*, 35 (1): 139-140.
- Elégbédé, M.T., Glitho, I.A., Akogbeto, M., Dannon, E.A., Mehinto, J.T., Kpindou, O. K.D., and Tamo, M., 2014. Influence of cotton plant on development of *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae). *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*, 4 (2): 40-46.
- Fischer, I., and Rezende, J., 2008. *Diseases of passionflower* (*Passiflora* spp.). Global Science Book, Hong Kong.
- Gioria, R., Bosque, G.G., Rezende, J.A.M., Amorim, L., and Kitajima, E.W., 2000. Incidência de viroses de maracujazeiro na Alta Paulista-SP e danos causados pelo Passion fruit woodiness virus. *Fitopatologia Brasileira*, 25: 182-189.
- Lima, J.A.A., Oliveira, V.B., and Torres, F.J., 1996. Avaliação dos graus de incidência de vírus em pomares de maracujazeiro, na Serra da Ibiapaba, Ceará. *Caatinga*, (9): 61-66.
- Rezende, J.A.M., 1994. Doenças de vírus e micoplasma do maracujazeiro no Brasil. In SÁO JOSÉ, A.R. *Maracujá: produção e mercado*. Vitória da Conquista: UESB, 116-125.

Study on biology and transmission ability of *East Asian Passiflora Virus* of aphid on passion fruit

Dang Quoc Chuong, Tran Thi My Hanh,
Nguyen Thien Dong, Nguyen Van Hoa

Abstract

Study on biological characteristics and transmission ability of *East Asian Passiflora Virus* (EAPV) of aphids (*A. gossypii*) on passion fruit trees was carried out at SOFRI from August 2020 to June 2021. The results showed that the lifecycle of *A. gossypii* on passion fruit is 8.06 days. The average reproductive rate of a female was 7.93 nymphs and laid in 5.17 days. The percentage of aphids that completed the life cycles on passion fruit was 37%. When disease aphids were released on free-disease seedlings at the density of 3, 5, 10, and 15 adults/seedling, the results showed that all seedlings were infected EAPV by aphids through positive results when tested by PCR technique at 15 days after treatment. The seedlings of the treatments at 10 and 15 adults/seedling showed disease symptoms with the rates of 3.33% and 13.33% at 60 days after treatment and at 90 days with rates of 33.67% and 53.33%.

Keywords: *A. gossypii*, passion fruit, woodiness, transmission

Ngày nhận bài: 16/10/2021

Ngày phản biện: 20/10/2021

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Việt

Ngày duyệt đăng: 29/10/2021

XÂY DỰNG QUY TRÌNH CHẨN ĐOÁN *East Asian Passiflora virus* GÂY BỆNH TRÊN CHANH DÂY (*Passiflora edulis* Sims) BẰNG REAL-TIME PCR

Huỳnh Nguyễn Minh Nghĩa¹, Nguyễn Đăng Quân¹, Nguyễn Xuân Dũng^{1*}

TÓM TẮT

East Asian Passiflora virus (EAPV) là một trong ba loại virus gây bệnh hóa bản vỏ trái ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng chanh dây. Để kiểm soát hiệu quả bệnh này cần phát hiện sớm và chính xác sự hiện diện của virus trên cây. Nghiên cứu này thiết lập quy trình phản ứng chuỗi polymerase thời gian thực (real-time polymerase chain reaction, RT-PCR) phát hiện virus từ mô lá chanh dây nhiễm bệnh. Phân đoạn gen mã hóa protein vỏ của virus được khuếch đại bằng phản ứng RT-PCR, tách dòng và kiểm chứng bằng phân tích trình tự trước khi thiết lập phản ứng RT-PCR. Ngưỡng phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của phản ứng khuếch đại cũng được xác định. Kết quả cho thấy phản ứng RT-PCR đã khuếch đại được phân đoạn gen (188 bp) tương đồng trên mức 90% so với các trình tự gen đã công bố của virus EAPV. Phản ứng RT-PCR

¹ Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

* Tác giả chính: E-mail: nxdung.snn@tphcm.gov.vn

có phương trình đường chuẩn dạng $y = -3,3346x + 40,924$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9903$. Ngưỡng phát hiện và giới hạn định lượng của phản ứng đạt mức tương ứng 100 và 1.000 bản sao/ μL . Các mẫu chanh dây thu thập bị nhiễm virus với số lượng dao động từ 10^5 đến 10^7 copies/ μL .

Từ khóa: Chanh dây (*Passiflora edulis* Sims), *East Asian Passiflora virus*, gen mã hóa protein vỏ, RT-PCR

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chanh dây (*Passiflora edulis* Sims) là cây trồng có giá trị kinh tế cao được trồng phổ biến ở các nước vùng nhiệt đới và á nhiệt đới trên thế giới. Tại Việt Nam, diện tích trồng chanh dây không ngừng gia tăng. Đặc biệt trong những năm gần đây, khu vực Tây Nguyên đã phát triển các vùng chuyên canh với sản lượng lên đến 20.000 tấn mỗi năm (Khuwikitjaru *et al.*, 2020) để đáp ứng nhu cầu tiêu thụ trong nước cũng như xuất khẩu. Tuy nhiên, chanh dây là loại cây khá nhạy cảm với nhiều nhóm bệnh do vi khuẩn, nấm và virus gây ra. Trong đó, bệnh hóa bản vỏ trái do một trong ba loài thuộc nhóm potyvirus gây ra, bao gồm *Passion woodiness virus* (PWV) (Kitajima *et al.*, 1997), *East Asian passiflora virus* (EAPV) (Chong *et al.*, 2018; Iwai *et al.*, 2006) và *South African passiflora virus* (SAPV) (Brand *et al.*, 1993; McKern *et al.*, 1994), được xem là nguyên nhân gây thiệt hại lớn nhất đối với năng suất và chất lượng quả chanh dây ở nhiều khu vực trên thế giới (Đỗ Duy Hưng và *ctv.*, 2018). Tại Việt Nam, virus gây bệnh chính trên chanh dây cũng đã được xác định là EAPV và PaMoV (*Passiflora mottle virus*) (Do *et al.*, 2021).

Việc kiểm soát virus gây bệnh trên chanh dây nói riêng cũng như cây trồng nói chung thường gặp rất nhiều khó khăn, do virus lây lan nhanh và cây bị nhiễm virus thường không biểu hiện triệu chứng ở giai đoạn đầu, nên không thể phát hiện và ngăn chặn kịp thời. Do đó, phát hiện sớm và chính xác sự hiện diện của virus trên cây trồng là vấn đề có ý nghĩa rất quan trọng.

Thông thường quy trình chẩn đoán virus có thể được thiết lập dựa trên các phương pháp khác nhau như ELISA, PCR và Real-time PCR. Trong đó, ELISA là phương pháp đơn giản, dễ sử dụng nhưng thường có độ nhạy không cao và tiêu tốn nhiều thời gian (Hu *et al.*, 1993). PCR thường được sử dụng rộng rãi cho chẩn đoán các loại virus nhưng có sự hạn chế về ngưỡng phát hiện đối với các mẫu có nồng độ virus rất thấp (Shafiq *et al.*, 2017). Real-time PCR là phương pháp có thể phát hiện và định lượng virus một cách chính xác và nhanh chóng hơn so với các phương pháp khác (Papayiannis *et*

al., 2010). Phương pháp này đã được sử dụng trong công tác kiểm soát bệnh virus và nghiên cứu tạo giống cây trồng kháng virus (Giovanna *et al.*, 2008).

Trong nghiên cứu này, phương pháp Real-time PCR đã được sử dụng để thiết lập quy trình phát hiện EAPV phục vụ cho việc kiểm soát virus gây bệnh trên chanh dây ở Việt Nam.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Mẫu lá chanh dây có biểu hiện triệu chứng bệnh hóa bản vỏ trái được thu thập ở các vườn trồng chanh dây tại tỉnh Đắk Lắk và Lâm Đồng, Việt Nam.

- Chủng vi khuẩn *E. Coli* DH5 α sử dụng cho thí nghiệm nhân dòng gen.

- Cặp mồi pJET1.2:

f: 5'-CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC-3'

r: 5'-AAGAAC ATCGATTTTCCATGGCAG-3'

- Các trình tự gen protein vỏ virus được thu thập từ ngân hàng gen NCBI (mã truy nhập: MH922995, AB627435, MH922996, KY077657, KY077654, MG257888, KY077653, KY077652, KY077658, MG257889, MK166862, MK166863, KY077651, MG257890, KY077655, MK166864) được dùng để thiết kế mồi.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế mồi phát hiện virus

Mồi phát hiện virus được thiết kế dựa trên trình tự gen của virus được công bố trên ngân hàng gen (NCBI) sau khi tiến hành so sánh để chọn lọc vùng bảo tồn. Sau đó, khả năng bắt cặp của mồi với các trình tự gen của virus EAPV và các potyvirus khác được kiểm tra bằng phần mềm FAST PCR.

2.2.2. Thu thập nguồn mẫu nhiễm virus

Mẫu lá được thu thập dựa trên các triệu chứng đặc trưng của bệnh hóa bản vỏ trái chanh dây (cây bị giảm kích thước và biến dạng do các lông thu ngắn lại; lá có các vết nhăn, vùng khảm, bong bóng hoặc vết phồng rộp trên bề mặt; quả biến dạng và hóa cứng) (Joy and Sherin, 2012). Sau khi thu thập,

mẫu được rửa sạch với nước, sau đó bảo quản ở nhiệt độ -80°C trong tủ âm sâu (Sanyo).

2.2.3. Ly trích RNA virus và khuếch đại gen

RNA được ly trích từ mẫu lá chanh dây nhiễm virus bằng GeneJET Plant RNA purification mini Kit (Thermo Fisher Scientific) theo hướng dẫn của hãng sản xuất. Đoạn gen mã hóa protein vỏ virus (CP) được khuếch đại bằng phản ứng PCR với cặp mồi đã được thiết kế. Phản ứng khuếch đại gen với tổng thể tích 25 μL chứa 12,5 μL Dreamtaq Green PCR Master Mix (2X), 10 μL Nuclease-free H_2O , 0,25 μL RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/ μL), RiboLock RNase Inhibitor (40 U/ μL), 0,5 μL (10 μM) mỗi loại mỗi xuôi và mỗi ngược, và 1 μL mẫu RNA. Chương trình nhiệt của phản ứng được thiết lập với 1 chu kỳ ở $50^{\circ}\text{C}/15$ phút; 1 chu kỳ ở $95^{\circ}\text{C}/5$ phút; 40 chu kỳ ở $95^{\circ}\text{C}/30$ giây, $T_a/30$ giây, $72^{\circ}\text{C}/30$ giây và 1 chu kỳ ở $72^{\circ}\text{C}/10$ phút. Trong đó, T_a là nhiệt độ bắt cặp mồi được thiết lập ở nhiệt độ thấp hơn nhiệt độ nóng chảy 3°C . Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5% trong thời gian 30 phút/100V, sau đó nhuộm với Ethidium Bromide (0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) trong 30 phút và quan sát bằng DNA khuếch đại trên máy chụp gel (Geldoc).

2.2.4. Tách dòng và kiểm tra trình tự gen

Đoạn gen mục tiêu sau khi khuếch đại được gắn vào vector pJET1.2 bằng Kit CloneJET™ PCR Cloning theo hướng dẫn của hãng cung cấp, sau đó hóa biến nạp vào vi khuẩn *E. Coli* DH5 α . Hiệu quả biến nạp được kiểm tra thông qua nuôi cấy vi khuẩn trên môi trường thạch LB bổ sung 100 mg/L ampicillin, ở 37°C trong khoảng 16 giờ. Dòng vi khuẩn có mang vector biến nạp chứa gen mục tiêu được xác định thông qua PCR với mồi pJET1.2. Plasmid được tách chiết từ các dòng vi khuẩn đã được biến nạp thành công bằng Kit DNA-Spin™ Plasmid DNA Purification (iNtRON) và gửi đi giải trình tự đoạn gen mục tiêu tại Phòng CNSH Y Dược, Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh. Trình tự đoạn gen tách dòng được phân tích so sánh với các trình tự gen đã được công bố của virus trên Ngân hàng gen NCBI.

2.2.5. Chuẩn bị mẫu chuẩn

Plasmid mang đoạn gen mục tiêu được sử dụng làm mẫu chuẩn xác định hàm lượng DNA và tính số lượng bản sao gen theo công thức của Staroscik và cộng tác viên (2004):

$$\text{Số bản sao gen} = \frac{\text{Khối lượng DNA} \times 6,022 \times 10^{23}}{\text{Chiều dài đoạn gen} \times 1 \times 10^9 \times 650}$$

Trong đó: Đơn vị khối lượng DNA: ng, chiều dài đoạn gen: bp. DNA plasmid sau khi xác định số bản sao sẽ được pha loãng theo hệ số bậc 10 thành các mẫu có nồng độ từ 10^6 đến 10^0 bản sao/ μL .

2.2.6. Thiết lập phản ứng real-time PCR

Phản ứng real-time PCR được thiết lập với các mẫu chuẩn có nồng độ 10^6 ; 10^5 ; và 10^4 bản sao/ μL . Phản ứng với tổng thể tích 25 μL chứa 12,5 μL Maxiam SYBR Green/Rox qPCR Master Mix (2X), 10,5 μL Nuclease-free H_2O , 0,5 μL (10 μM) mỗi loại mỗi xuôi và mỗi ngược, và 1,0 μL mẫu DNA. Chương trình nhiệt được thiết lập với 1 chu kỳ ở $95^{\circ}\text{C}/5$ phút; 40 chu kỳ ở $95^{\circ}\text{C}/30$ giây, $50^{\circ}\text{C}/30$ giây, $72^{\circ}\text{C}/30$ giây; 1 chu kỳ ở $95^{\circ}\text{C}/10$ giây, 65°C 1 phút, 97°C 1 giây; và 1 chu kỳ ở 37°C 30 giây. Phân tích kết quả phản ứng thông qua biểu đồ tín hiệu huỳnh quang và nhiệt độ nóng chảy (melt-curve) thể hiện trên màn hình máy real-time PCR (LightCycler® 96, Roche).

2.2.7. Thiết lập đường chuẩn cho phản ứng real-time PCR

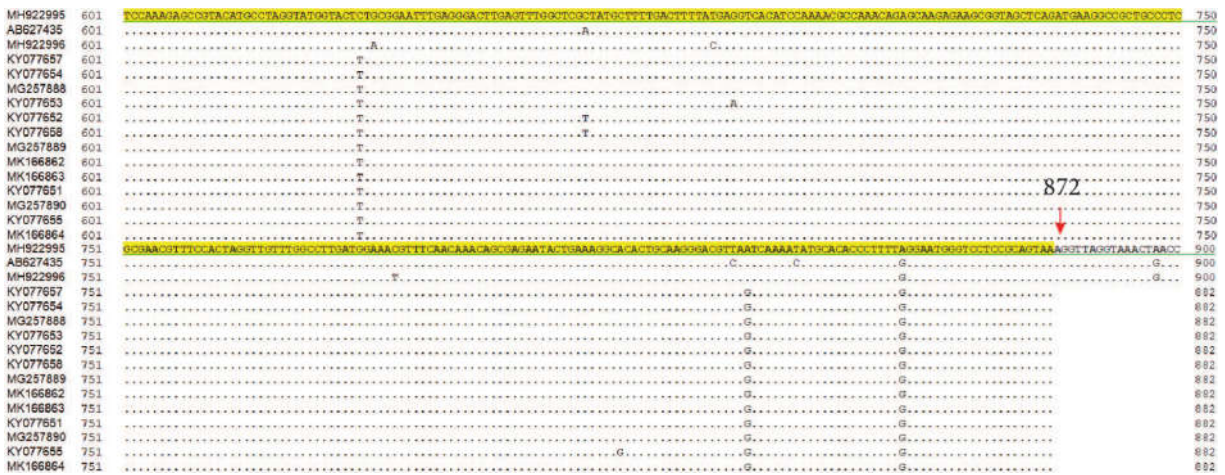
Thực hiện phản ứng real-time PCR lặp lại 3 lần với các mẫu chuẩn có số bản sao từ 10^7 đến 10^0 bản sao/ μL . Xác định chu kỳ ngưỡng (Ct) của phản ứng tương ứng với các giá trị số bản sao của mẫu chuẩn. Đường chuẩn được xây dựng dựa trên chu kỳ ngưỡng (Ct) và giá trị log (số bản sao) tương ứng của các mẫu chuẩn. Phương trình đường chuẩn có dạng $Y = aX + b$, trong đó X: Ct và Y: log (số bản sao).

2.2.8. Xác định ngưỡng phát hiện của phản ứng real-time PCR

Thực hiện phản ứng real-time PCR lặp lại 10 lần với mẫu chuẩn có số bản sao thấp nhất mà phản ứng có thể phát hiện được (tín hiệu huỳnh quang của mẫu chuẩn vượt trên tín hiệu nền). Ngưỡng phát hiện LOD của phản ứng sẽ được xác lập ở giá trị số bản sao được kiểm tra khi tất cả 10 lần lặp lại đều cho kết quả dương tính. Trong trường hợp số lần cho kết quả dương tính nhỏ hơn 10, việc xác định ngưỡng phát hiện sẽ được thực hiện lại với mẫu chuẩn có số bản sao cao hơn liền kề.

2.2.9. Xác định giới hạn định lượng của phản ứng real-time PCR

Thực hiện phản ứng real-time PCR định lượng các mẫu chuẩn có số bản sao gen mục tiêu khác



Hình 1. Kết quả so sánh các trình tự gen protein vỏ của EAPV đã được công bố trên ngân hàng gen NCBI

Từ trình tự tương đồng đã chọn, mỗi được thiết kế có chiều dài 20 nucleotide, tỷ lệ GC 40 - 55% và nhiệt độ nóng chảy từ 52 - 55°C (Bảng 1). Do được thiết kế trên vùng tương đồng giữa các trình tự đã công bố nên mỗi có khả năng phát hiện được các chủng virus khác nhau. Ngoài ra, với kích thước

sản phẩm khuếch đại nhỏ hơn nên mỗi cũng sẽ cho hiệu suất phản ứng Real-time PCR tốt hơn (Debode *et. al.*, 2017) so với các môi có sản phẩm lớn hơn đã được sử dụng để phát hiện virus EAPV-AO (527 bp) và EAPV-IB (615 bp) trong nghiên cứu trước đây (Chong *et al.*, 2018).

Bảng 1. Trình tự và các thông số cơ bản của mỗi được thiết kế

Tên	Trình tự (5' - 3')	Độ dài	%GC	Tm (°C)	Sản phẩm (bp)
EAPV	CCCGACTGCAAAAGATCAC	20	55,00	52,80	188
	TGATTGTCATCCAGCTCATA	20	40,00	55,00	

Kết quả phân tích khả năng bắt cặp với các *potyvirus* khác cũng cho thấy chỉ có mỗi ngược có khả năng bắt cặp với trình tự của *Sesame mosaic potyvirus* (U90326) và *Ceratobium mosaic potyvirus*

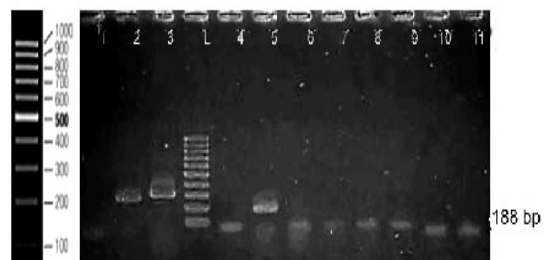
(AF022445) với tỷ lệ tương ứng 90% và 88% (Bảng 2). Điều này cho thấy, mỗi được thiết kế trong trường hợp này không có khả năng khuếch đại các trình tự *potyvirus* khác.

Bảng 2. Kết quả phân tích khả năng khuếch đại của mỗi EAP trên trình tự gen của các *potyvirus* khác nhau

Trình tự	Tỷ lệ bắt cặp (%)		Vị trí bắt cặp		Sản phẩm (bp)
	EAPV-f	EAPV-r	EAPV-f	EAPV-r	
U90326	-	90	-	562-581	-
AF022445	-	88	-	961-980	-

3.2. Khuếch đại phân đoạn gen mục tiêu của virus

Phản ứng RT-PCR đã thu được bằng DNA ở vị trí khoảng 200 bp, phù hợp với sản phẩm dự kiến (188 bp) của cặp mỗi EAP (Hình 2). Kết quả này bước đầu cho thấy đã khuếch đại được phân đoạn gen phù hợp với phân đoạn gen mục tiêu. Tuy nhiên, vẫn không thể chắc chắn trình tự đã được khuếch đại có thực sự là trình tự gen của virus hay không, bởi vì mỗi vẫn có khả năng bắt cặp và khuếch đại một đoạn RNA nào đó trong RNA mẫu. Vì vậy, để khẳng định chắc chắn điều này, phân đoạn DNA (kích thước khoảng 200 bp) thu được sau khi thực hiện phản ứng khuếch đại đã được dòng hóa và giải trình tự.

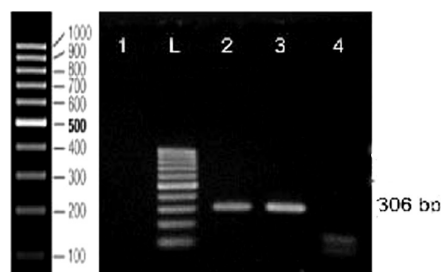


Hình 2. Kết quả điện di sản phẩm RT-PCR khuếch đại gen virus EAPV

Ghi chú: 1: chứng âm, 2: chứng dương (khuếch đại RNA của CyMV, 257 bp), 3: kiểm chứng PCR (297 bp); L: thang DNA; 4 - 11: RNA ly trích từ lá chanh dây.

3.3. Tách dòng và kiểm tra trình tự của đoạn gen khuếch đại

Khi vector pJET1.2 có mang phân đoạn gen mục tiêu được biến nạp vào vi khuẩn, các dòng vi khuẩn biến nạp sẽ phát triển và tạo khuẩn lạc trên môi trường chứa ampicilin do pJET1.2 có mang gen kháng ampicilin và gen chọn lọc âm *eco47IR* (loại bỏ các dòng mang vector tự đóng vòng). Kết quả biến nạp đã thu được các dòng vi khuẩn phát triển trên môi trường LB bổ sung 100 mg/L ampicilin, cho thấy quá trình biến nạp đã thành công. Tuy nhiên, để đảm bảo chắc chắn đoạn gen được gắn vào vector đúng là gen mục tiêu, các khuẩn lạc đã được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi pJET1.2. Kết quả phản ứng đã thu được phân đoạn DNA có kích thước phù hợp với dự kiến (306 bp), bao gồm kích thước của phân đoạn được chèn (188 bp) và kích thước của một đoạn gen trên plasmid (118 bp). Điều này cho thấy các dòng vi khuẩn được kiểm tra có mang vector chứa gen mục tiêu (Hình 3).



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra khuẩn lạc với cặp mồi pJET1.2

Ghi chú: L: thang DNA, 1: chứng âm, 2-4: mẫu khuẩn lạc.

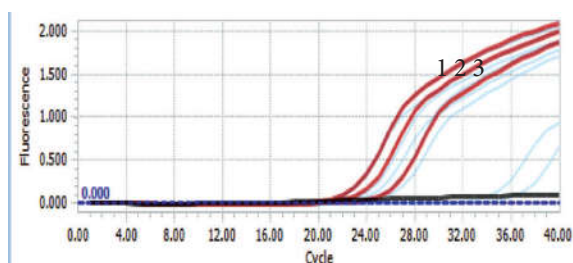
Kết quả giải trình tự plasmid và so sánh trên ngân hàng gen NCBI cho thấy phân đoạn gen được dòng hóa vào vi khuẩn có trình tự tương đồng ở mức trên 90% với trình tự tương ứng của *EAPV* đã được công bố (Hình 4). Điều này cho thấy phân đoạn gen được tách dòng và khuếch đại được là đoạn trình tự gen mã hóa CP của *EAPV*.

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Access
KT724930.1 East Asian Passiflora virus isolate EAPV-IB-dpdl complete genome	272	272	100%	9e-76	93.09%	10151	Query_11
MH922995.1 East Asian Passiflora virus strain EAPV-IB isolate WF2 coat protein gene partial cds	272	272	100%	9e-76	93.09%	1376	Query_11
MH922996.1 East Asian Passiflora virus strain EAPV-IB isolate DC8 coat protein gene partial cds	272	272	100%	9e-76	93.09%	1376	Query_11
AB627435.1 East Asian Passiflora virus CP gene for coat protein partial cds isolate Arata	267	267	100%	4e-74	92.55%	1229	Query_11
KY077656.1 East Asian Passiflora virus isolate GH15-1 coat protein gene partial cds	267	267	100%	4e-74	92.55%	882	Query_11
MK166865.1 East Asian Passiflora virus isolate JB17-15 coat protein gene partial cds	267	267	100%	4e-74	92.55%	882	Query_11
MH922994.1 East Asian Passiflora virus strain EAPV-IB isolate DC7 coat protein gene partial cds	261	261	100%	2e-72	92.02%	1376	Query_11
KY077652.1 East Asian Passiflora virus isolate DY16-1 coat protein gene partial cds	261	261	100%	2e-72	92.02%	882	Query_11
KY077653.1 East Asian Passiflora virus isolate NJ14-1 coat protein gene partial cds	261	261	100%	2e-72	92.02%	882	Query_11

Hình 4. Kết quả so sánh trình tự đoạn gen khuếch đại với các trình tự gen *EAPV* được công bố trên ngân hàng Gen NCBI

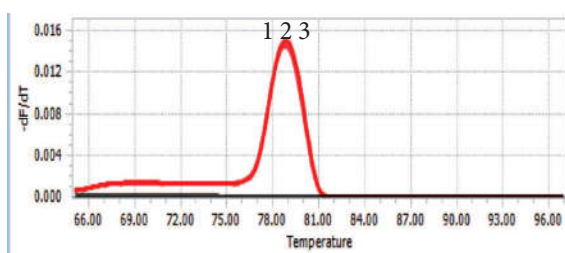
3.4. Thiết lập phản ứng Real-time PCR

Phản ứng Real-time PCR phát hiện *EAPV* cho sản phẩm khuếch đại được thể hiện bằng đường biểu diễn tín hiệu huỳnh quang. Trong đó, đường biểu diễn tín hiệu của các mẫu có số bản sao 10^6 , 10^5 , $10^4/\mu\text{L}$ đều vượt trên tín hiệu nền (Hình 5), với chu kỳ ngưỡng lần lượt là 23,19; 25,38; 27,01. Sản phẩm khuếch đại của cả 3 mẫu có nhiệt độ nóng chảy (T_m) ở khoảng 78°C (Hình 6). Điều này cho thấy, việc thử nghiệm phản ứng Real-time PCR khuếch đại phân đoạn gen mục tiêu đã thực hiện thành công.



Hình 5. Biểu đồ khuếch đại phân đoạn gen mục tiêu dựa trên tín hiệu huỳnh quang

Ghi chú: Trục tung (Y): Cường độ huỳnh quang, trục hoành (X): Chu kỳ nhiệt. N: chứng âm; 1: mẫu 10^6 bản sao/ μL ; 2: mẫu 10^5 bản sao/ μL ; 3: mẫu 10^4 bản sao/ μL .



Hình 6. Biểu đồ phân tích nhiệt độ nóng chảy phân đoạn gen mục tiêu

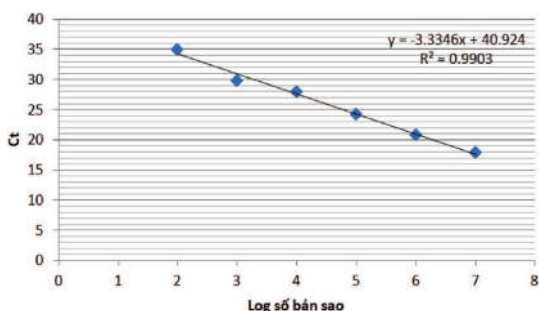
Ghi chú: N: chứng âm; 1, 2, 3: mẫu 10^6 , 10^5 , 10^4 bản sao/ μL .

3.5. Thiết lập đường chuẩn cho phản ứng real-time PCR

Đường chuẩn đã được thiết lập dựa trên giá trị chu kỳ ngưỡng (Ct) thu được khi thực hiện phản ứng real-time PCR với các mẫu chuẩn có số lượng bản sao thay đổi từ 10^7 - 10^2 bản sao/ μL (Bảng 3). Phương trình đường chuẩn có dạng $y = -3,3346x + 40,924$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9903$ (Hình 7).

Bảng 3. Giá trị Ct của phản ứng khuếch đại gen

Mẫu (bản sao/ μL)	Log số bản sao	Ct
10^7	7	16,04
10^6	6	19,42
10^5	5	22,99
10^4	4	25,84
10^3	3	29,20
10^2	2	33,43



Hình 7. Biểu đồ đường chuẩn của phản ứng khuếch đại phân đoạn gen mục tiêu

3.6. Xác định giới hạn phát hiện của phản ứng real-time PCR

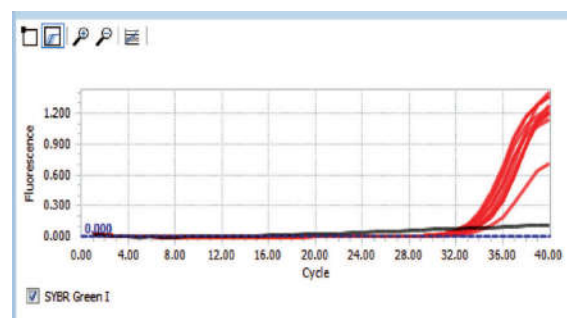
Với 6 mẫu chuẩn (có số bản sao từ 10^0 - 10^6 bản sao/ μL) được sử dụng, phản ứng real-time PCR chỉ cho tín hiệu khuếch đại ở các mẫu có 10^2 đến 10^6 (bản sao/ μL), với chu kỳ ngưỡng có giá trị thay

đổi từ 32,87 đến 20,17 (Bảng 4). Điều này cho thấy mẫu có số bản sao thấp nhất có thể phát hiện được trong trường hợp này là 10^2 (bản sao/ μL).

Bảng 4. Kết quả phản ứng Real-time PCR khuếch đại gen

Số bản sao/ μL	Ct_{tb}
10^6	$20,17 \pm 0,30$
10^5	$23,44 \pm 0,56$
10^4	$27,21 \pm 0,69$
10^3 N	$30,03 \pm 0,21$
10^2	$32,87 \pm 0,25$
10^1	-
10^0	-

Kết quả thực hiện phản ứng lặp lại 10 lần với mẫu có 10^2 bản sao/ μL đều thu được tín hiệu khuếch đại ở tất cả các lần lặp lại với giá trị chu kỳ ngưỡng trung bình ở mức 32,87 (Hình 8).



Hình 8. Biểu đồ tín hiệu huỳnh quang khuếch đại gen với mẫu có 10^2 bản sao/ μL

Như vậy, ngưỡng phát hiện của phản ứng có thể được xác định ở mức 10^2 bản sao/ μL . Với ngưỡng phát hiện này, phản ứng real-time PCR có thể cho phép phát hiện được sự hiện diện của virus trong cây ở giai đoạn sớm. Kết quả này có ý quan trọng đối với việc tầm soát virus cũng như chọn lọc nguồn cây đầu dòng sạch virus.

3.7. Xác định giới hạn định lượng của phản ứng real-time PCR

Giới hạn định lượng của phản ứng real-time PCR được phân tích với mẫu ở các nồng độ 10^2 , 10^3 , 10^4 bản sao/ μL . Kết quả cho thấy, giá trị RSD của phản ứng đạt mức thấp hơn 25% ở mẫu có nồng độ 10^2 và 10^3 bản sao/ μL (Bảng 5). Và mẫu có nồng độ thấp nhất mà ở đó phản ứng có giá trị RSD phù hợp ($\leq 25\%$) là 10^3 bản sao/ μL . Như vậy, giới hạn định lượng được của phản ứng có thể được xác định ở mức 10^3 bản sao/ μL .

Bảng 5. Kết quả xác định giới hạn định lượng phản ứng real-time PCR khuếch đại gen

Số bản sao lý thuyết	Số bản sao thực nghiệm	Độ chệch (%)	SD	RSD (%)
10 ²	170,649	-70,649	119,64	69,830
10 ³	1386,955	-38,696	338,812	24,430
10 ⁴	9114,357	8,856	1399,102	15,350

3.8. Định lượng virus trong mẫu chanh dây

Virus có trong mẫu lá chanh dây được định lượng dựa trên số lượng phân đoạn gen mục tiêu. Giá trị này được tính toán dựa trên đường chuẩn đã thiết lập và chu kỳ ngưỡng trung bình của mẫu thử nghiệm (Bảng 6). Giá trị định lượng virus dao động từ $3,30 \times 10^5$ đến $5,06 \times 10^7$ số bản sao/ μ L.

Bảng 6. Giá trị Ct trung bình của mẫu lá chanh dây đã thu thập và giá trị định lượng tương ứng

Kí hiệu mẫu	Ct trung bình	Giá trị định lượng (Số bản sao/ μ L)
DD_01	12,73	$2,79 \times 10^7$
DD_02	12,72	$2,81 \times 10^7$
DD_03	14,65	$8,06 \times 10^6$
DD_04	14,77	$7,44 \times 10^6$
DD_05	15,51	$4,61 \times 10^6$
DD_06	16,08	$3,20 \times 10^6$
DD_07	11,60	$5,79 \times 10^6$
DD_08	12,12	$4,15 \times 10^6$
DD_09	12,95	$2,42 \times 10^6$
BMT_01	19,59	$3,30 \times 10^5$
BMT_02	14,32	$1,00 \times 10^7$
BMT_03	15,21	$5,61 \times 10^6$
BMT_04	12,82	$2,64 \times 10^7$
BMT_05	13,56	$1,63 \times 10^7$
BMT_06	14,59	$8,36 \times 10^6$
BMT_07	13,47	$1,73 \times 10^7$
BMT_08	13,94	$1,28 \times 10^7$
BMT_09	13,98	$1,24 \times 10^7$
BMT_10	11,81	$5,06 \times 10^7$
BMT_11	12,43	$3,39 \times 10^7$
BMT_12	13,26	$1,98 \times 10^7$
BMT_13	14,64	$8,11 \times 10^6$
BMT_14	15,21	$5,60 \times 10^6$
BMT_15	14,11	$1,14 \times 10^7$

IV. KẾT LUẬN

Đã thiết lập được quy trình phát hiện virus EAPV gây bệnh trên chanh dây bằng RT-PCR với ngưỡng phát hiện và định lượng ở mức tương ứng 10² và 10³ bản sao/mL. Quy trình phát hiện được sử dụng để định lượng virus trong các mẫu chanh dây với lượng virus dao động từ $3,30 \times 10^5$ đến $5,06 \times 10^7$ số bản sao/ μ L.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Đỗ Duy Hưng, Nguyễn Thị Bích Ngọc, Nguyễn Nam Dương, Phạm Thị Dung, Ngô Thị Thanh Hương, Lê Mai Nhất, Hà Minh Thanh,** 2018. Ứng dụng kỹ thuật One-step RT-PCR chẩn đoán bệnh cứng trái do vi rút (*East Asian Passiflora Virus - EAPV*) gây bệnh trên chanh leo ở Việt Nam, *Tạp chí Bảo vệ thực vật*, 5: 63-67.
- Brand, R.J., Burger, J.T., Rybicki, E.P.,** 1993. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the coat protein gene of a new potyvirus infecting *South African passiflora*. *Archives of Virology*, 128 (1): 29-41.
- Chong, Y.H., Cheng, Y.H., Cheng, H.W., Huang, Y.C., Yeh, S.D.,** 2018. The virus causing passionfruit woodiness disease in Taiwan is reclassified as *East Asian passiflora virus*. *Journal of General Plant Pathology*, 84 (3): 208-220.
- Debode, F., Marien, A., Janssen, É., Bragard, C., Berden, G.,** 2017. The influence of amplicon length on real-time PCR results. *BASE*, 21 (1): 3-11.
- Do, D.H., Chong, Y.H., Ha, V.C., Cheng, H.W., Chen, Y.K., Bui, T.N.L., Yeh, S.D.,** 2021. Characterization and detection of *Passiflora mottle virus* and other two potyviruses causing passionfruit woodiness disease in Vietnam. *Phytopathology*, 111(9): 1675-1685. doi: 10.1094/PHYTO-10-20-0481-R. Epub 2021 Oct 28.
- Giovanna, M., Piero, C., Gian, P.A., Emanuela, N.,** 2008. Real-time PCR for the quantitation of *tomato yellow leaf curl Sardinia virus* in tomato plants and in *Bemisia tabaci*. *Journal of Virological Methods*, 147: 282-289.
- Hu, J.S., Ferreira S., Wang M.,** 1993. Detection of *cymbidium mosaic virus*, *odontoglossum ringspot virus*, *tomato spotted wilt virus*, and potyviruses infecting orchids in Hawaii. *Plant Disease*, 77 (5): 464-468.

- Iwai, H., Terahara, R., Yamashita, Y., Ueda, S., Nakamura, M., 2006. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of an Amami-O-shima strain of *East Asian Passiflora* potyvirus. *Archives of virology*, 151 (7): 1457-1460.
- Joy, P.P., and Sherin, C.G., 2012. Diseases of Passion fruit (*Passiflora edulis*) pathogen, symptoms, infection, spread and management.
- Khuwijitjaru, P., Klinchongkon, K., 2020. *Passion fruit*. Valorization of Fruit Processing By-products. Acedemic Press: 183-201.
- Kitajima, E.W., Rezende, J.A.M., Rodrigues, J.C.V., Chiavegato, L.G., Piza Júnior, C.T., Morozini, W., 1997. Green spot of passion fruit, a possible viral disease associated with infestation by the mite *Brevipalpus phoenicis*. *Fitopatologia Brasileira*, 22 (4): 555-559.
- McKern, N.M., Strike, P.M., Barnett, O.W., Dijkstra, J., Shukla, D.D., Ward, C.W., 1994. *Cowpea aphid borne mosaic virus*-Morocco and *South African Passiflora virus* are strains of the same potyvirus. *Archives of Virology*, 136 (1): 207-217.
- Papayiannis, L.C., Iacovides, T.A., Katis, N.I., Brown, J.K., 2010. Differentiation of *tomato yellow leaf curl virus* and *tomato yellow leaf curl Sardinia virus* using real-time TaqMan® PCR. *Journal of Virological Methods*, 165: 238-245.
- Shafiq, M., Iqbal Z., Ali, I., Abbas, Q., Mansoor, S., Briddon, R.W., Armin, I., 2017. Real-time quantitative PCR assay for the quantification of virus and satellites causing leaf curl disease in cotton in Pakistan. *Journal of Virological Methods*, 248: 54-60.
- Staroscik A., 2004. *Calculator for determining the number of copies of a template*. URI Genomics & Sequencing Center, accessed on 26 January 2018. Available from <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>.

Development of diagnostic procedure for *East Asian Passiflora virus* affecting passion fruit (*Passiflora edulis* Sim) by RT-PCR

Huynh Nguyen Minh Nghia, Nguyen Dang Quan, Nguyen Xuan Dung

Abstract

East Asian Passiflora virus (EAPV) is one of three viruses that cause woodiness disease which seriously affects the yield and quality of passion fruit. It is necessary to detect early and accurately the presence of viruses on passion fruit for effective control. This study establishes a RT-PCR procedure for virus detection using RNA extracted from infected passion fruit leaf tissue. The viral coat protein-coding gene segment was amplified by RT-PCR, cloned, and sequenced prior to the establishment of the RT-PCR. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of the amplification reaction were also determined. The results showed that the RT-PCR successfully amplified a gene segment of ~188 bp which is 86.17-93.09% homologous to the published EAPV gene sequences. The RT-PCR presents a calibration curve $y = -3.3346x + 40,924$, the correlation coefficient $R^2 = 0.9903$. The response thresholds for detection and quantification were 100 and 1000 copies/ μ L, respectively. The passion fruit samples in the collection were infected with the number of viruses from 105-107 copies/ μ L as diagnosed by the established method.

Keywords: Passion fruit (*Passiflora edulis* Sims), *East Asian Passiflora virus*, coat protein gene, RT-PCR

Ngày nhận bài: 30/9/2021

Ngày phản biện: 06/10/2021

Người phản biện: TS. Trần Đức Trung

Ngày duyệt đăng: 29/10/2021

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ KIỂM SOÁT BỆNH CỦA VI KHUẨN BẢN ĐỊA ĐỐI KHÁNG TRIỂN VỌNG ĐỐI VỚI BỆNH ĐỐM LÁ (*Xanthomonas* spp.) TRÊN CÂY HOA HỒNG (*Rosa* spp.)

Lê Uyển Thanh^{1,2*}, Tô Lan Phương¹,
Trần Đình Giới³, Nguyễn Đức Độ²

TÓM TẮT

Trong điều kiện ngoài đồng, kết quả đánh giá hiệu quả kiểm soát bệnh của ba dòng vi khuẩn X61, G24 (*Bacillus subtilis*) và T265 (*Paenibacillus elgii*) đối với ba dòng XR13, XR9, XR18 (*Xanthomonas* spp.) gây bệnh đốm lá trên cây hoa hồng đã ghi nhận các nghiệm thức có xử lý với vi khuẩn đối kháng đều đạt hiệu quả kiểm soát bệnh cao. Trong đó, dòng X61 và T265 có hiệu quả giảm bệnh tương đương nhau, dao động từ 58,3% đến 65,2%. Với hiệu quả giảm bệnh cao nhất, dòng G24 lần lượt đạt 74,5%, 75,7% và 75,6% đối với XR13, XR9 và XR18, tương ứng. Phân tích chỉ số AUDPC của X61, T265, G24 đều ghi nhận thấp hơn từ 2,1 đến 5 lần so với nghiệm thức chỉ lây bệnh. Trong đó, dòng G24 đạt chỉ số AUDPC thấp hơn từ 1,6 đến 2 lần so với X61 và T265. Nhìn chung, có thể sử dụng ba dòng vi khuẩn đối kháng G24, X61, T265 để kiểm soát bệnh đốm lá do *Xanthomonas* spp. gây ra trên cây hoa hồng. Trong đó, dòng G24 đạt hiệu quả kiểm soát bệnh cao nhất và có tiềm năng được sử dụng như tác nhân kiểm soát bệnh sinh học trên cây trồng.

Từ khóa: Cây hoa hồng, chỉ số AUDPC, hiệu quả giảm bệnh, vi khuẩn đối kháng, *Xanthomonas* spp.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Vi khuẩn thuộc chi *Xanthomonas* là nguyên nhân gây bệnh trên nhiều loài cây trồng kinh tế quan trọng như lúa, cây có múi, sắn, cà chua, ớt, đậu, chanh dây, mía, chuối,...(Ryan *et al.*, 2011). Trên cây hoa hồng (*Rosa* spp.), *X. axonopodis* được ghi nhận gây bệnh đốm lá tại Texas và Florida, Hoa Kỳ (Huang *et al.*, 2013). Tại làng hoa Sa Đéc tỉnh Đồng Tháp, dòng *Xanthomonas* spp. được xác định gây bệnh đốm lá trên cây hoa hồng (Nguyễn Thị Thu Cúc và Trần Thị Thu Thủy, 2014). Bệnh do *Xanthomonas* spp. có thể được truyền sang cây trồng khỏe mạnh bằng các hoạt động canh tác như cắt tỉa, phun sương, nước mưa, bụi đất và có thể do côn trùng.

Việc sử dụng thường xuyên thuốc trừ bệnh hóa học đã dẫn đến nhiều tác động không mong muốn như ô nhiễm môi trường, gây độc tính do tồn dư trên sản phẩm, và có thể phát sinh tính kháng thuốc của mầm bệnh. Phòng trừ sinh học là một biện pháp thay thế đầy triển vọng vì có nhiều ưu điểm về tính bền vững, phương thức hoạt động và độc tính so với thuốc trừ bệnh hóa học. Kiểm soát sinh học bằng cách sử dụng vi sinh vật và các sản phẩm của chúng đã được chứng minh là có hiệu

quả trong việc kiểm soát các loài *Xanthomonas* spp. (Murate *et al.*, 2015). Trong nghiên cứu này, đánh giá hiệu quả kiểm soát bệnh của ba dòng vi khuẩn đối kháng triển vọng (X61, G24 và T265) đối với ba dòng *Xanthomonas* spp. (XR13, XR9, XR18) gây bệnh đốm lá trên cây hoa hồng được thực hiện ở điều kiện ngoài đồng, nhằm chọn ra được dòng vi khuẩn có hiệu quả kiểm soát bệnh cao nhất trong phòng trừ bệnh đốm lá vi khuẩn trên cây hoa hồng.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Ba dòng vi khuẩn đối kháng X61, G24 (*Bacillus subtilis*) và T265 (*Paenibacillus elgii*) được phân lập và tuyển chọn từ mẫu đất thu thập tại ba vùng sinh thái đại diện tại tỉnh Đồng Tháp, gồm Khu du lịch sinh thái Gáo Giồng, Khu di tích lịch sử văn hóa Xẻo Quýt, Vườn Quốc gia Tràm Chim (Lê Uyển Thanh và *ctv.*, 2021). Ba dòng vi khuẩn gây bệnh *Xanthomonas* spp. (XR13, XR9 và XR18) được phân lập từ vết bệnh đốm lá trên lá của cây hoa hồng lửa (*Rosa* spp.) tại làng hoa Sa Đéc, tỉnh Đồng Tháp và được lưu giữ tại Trường Đại học Đồng Tháp.

- Môi trường nuôi cấy vi sinh vật như môi trường King's B, nước cất vô trùng.

¹ Đại học Đồng Tháp; ² Đại học Cần Thơ

³ Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long

* Tác giả chính: E-mail: uyenthanh0809@gmail.com